

Abstract (Basic): EP 488170 A

Test for receptors contains (i) binding partner (BP) I which is a fusion protein of the protein to be examined (x) and a carrier (y), BPI being coupled to a solid phase pref. by an antiserum or a monoclonal antibody with x retaining its binding potential, and (ii) a different, labelled BPII for measurement of activity. Pref. X is derived from a) the extra-cellular domain of a cellular receptor, such as cytokine-growth factor-, hormone or neurotransmitter-receptors, b) a pathogen receptor, c) the extra-cellular domain of a cell adhesion mol. or d) a soluble protein. Pref. Y is derived from an immunoglobulin, such as the constant part of the heavy chain, e.g. from IgG1.

Also claimed is a method for the prodn. of the test and its use, i.e. for receptor screening and the characterisation of antibodies.

USE/ADVANTAGE - The test is claimed for the identification of 1) natural or artificial agonists or antagonists (receptor screening), 2) antibodies, 3) biological activity of soluble cellular receptors, 4) functional analysis of modified ligands, and 5) diagnostic of therapeutic substances. The problem of a limited number of receptor mols. on receptor membranes available for tests is overcome by providing a specific, simple and sensitive test in which a large number of combinations of mols. can be screened for their characteristics.

Dwg.1/15

Abstract (Equivalent): EP 488170 B

A cell-free binding assay for investigating the binding behaviour of receptor proteins, which are normally in the cell membrane, toward natural or artificial ligands, comprising: (1) a binding partner I which is a recombinant fusion protein composed of a receptor protein relevant for the binding to be investigated and of a carrier protein, where said fusion protein is coupled by means of an antiserum or monoclonal antibody, with retention of the binding activity of said receptor protein, to a suitable solid phase, and (2) a binding partner II which is a ligand, which is labelled in a manner suitable for measuring the binding to said receptor protein, for said receptor protein but is not an antibody.

Dwg.1/15

Abstract (Equivalent): US 5639597 A

An article for a binding assay for investigating binding behaviour of a cellular receptor protein to a labelled natural or artificial ligand comprising

(1) a binding partner I which is a recombinant fusion protein comprising a cellular receptor linked to a carrier protein, wherein said carrier protein is an immunoglobulin and further wherein said carrier protein is bound to a solid phase by an antiserum or monoclonal antibody thereby retaining binding activity of the receptor to a binding partner II, and

(2) binding partner II which is a labelled natural or artificial ligand.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: **0 488 170 A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 91120187.9

(51) Int. Cl.⁵: **G01N 33/68, G01N 33/566,
G01N 33/543, //C12N15/62**

(22) Anmeldetag: 26.11.91

(30) Priorität: 28.11.90 DE 4037837

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
03.06.92 Patentblatt 92/23

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: **BEHRINGWERKE**
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
W-3550 Marburg 1(DE)

(72) Erfinder: **Lauffer, Leander, Dr.**

**Walter-Voss-Weg 4
W-3550 Marburg(DE)**
Erfinder: **Zettlmeissl, Gerd, Dr.**
**Elbingerstrasse 3
W-3552 Wetter(DE)**
Erfinder: **Oquendo, Patricia, Dr.**
**Walter-Voss-Weg 4
W-3550 Marburg(DE)**

(74) Vertreter: **Aulmich, Gerhard, Dr. et al**
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(54) **Zellfreie Rezeptorbindungsteste, ihre Herstellung und Verwendung.**

(57) Die Erfindung betrifft zellfreie Rezeptorbindungsteste, die es erlauben, das Bindungsverhalten von zellmembranständigen Rezeptorproteinen gegenüber natürlichen oder künstlichen Liganden zu untersuchen. Dabei wird der jeweilige Rezeptor mit einem geeigneten Trägermolekül, vorzugsweise der schweren Kette eines Immunglobulins, verknüpft und über den Träger unter Erhalt seiner biologischen Eigenschaft an eine geeignete Festphase gebunden.

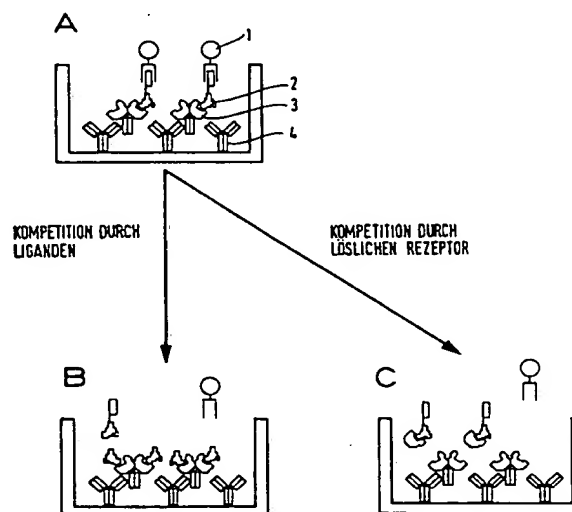


Fig. 1

A3 - 08/815,773

EP 0 488 170 A1

Die Erfindung betrifft zellfreie Rezeptorbindungsteste, die es erlauben, das Bindungsverhalten von zellmembranständigen Rezeptorproteinen gegenüber natürlichen oder künstlichen Liganden zu untersuchen. Dabei wird der jeweilige Rezeptor mit einem geeigneten Trägermolekül, vorzugsweise der schweren Kette eines Immunglobulins, verknüpft und über den Träger unter Erhalt seiner biologischen Eigenschaft an eine geeignete Festphase gebunden.

Für viele biologische und medizinische Fragestellungen ist die Bestimmung des Bindungsverhaltens von zellmembranständigen Rezeptorproteinen gegenüber natürlichen oder künstlichen Liganden von Bedeutung. Hierfür wird üblicherweise ein Ligand radioaktiv markiert und seine spezifische Bindung durch geeignete Methoden wie Gleichgewichtszentrifugation, Gleichgewichtsdialyse oder Filtration bestimmt. Die Rezeptormoleküle können hierbei zellgebunden bleiben, in welchem Fall der Test mit ganzen Zellen ausgeführt wird, können jedoch auch in subzellulären Fraktionen wie Membranvesikeln vorliegen oder auch mit geeigneten Detergentien aus der Zellmembran extrahiert und in Detergens-Mizellen stabilisiert werden. Die genannten Rezeptorbindungstests werden mit abnehmender Anzahl von Rezeptormolekülen in der Zellmembran zunehmend schwieriger durchzuführen. Viele Rezeptoren, insbesondere auch solche von großem medizinischen Interesse, werden normalerweise in nur geringem Ausmaß (in der Größenordnung von einigen Hundert bis einigen Tausend Molekülen pro Zelle) auf der Zelloberfläche exprimiert. Hierzu gehören z. B. die Rezeptoren für Granulocyten/Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), viele Interleukine, Erythropoietin, Tumornekrosefaktor (TNF) etc.

Bevorzugtes Ziel der vorliegenden Erfindung war es, geeignete Bindungsteste für vorzugsweise solche Rezeptoren zu entwickeln. Ein spezifischer, sensibler und einfach durchzuführender Bindungstest für diese und andere Rezeptoren würde es z. B. ermöglichen, eine große Anzahl von Verbindungen auf ihre Bindungseigenschaften zu testen, um so Agonisten- oder Antagonistenkandidaten zu identifizieren ("Rezeptorscreening"). Darüber hinaus könnten mit solchen Testen auch Antikörper gerichtet gegen Rezeptoren oder Liganden daraufhin überprüft werden, ob sie gegen Epitope, die in der Bindung eine Rolle spielen, gerichtet sind. Erfindungsgemäß bestand die Aufgabe darin, ein solches Testsystem herzustellen. Aus den EP-A 0325 262, EP-A 0314 317 und der deutschen Patentanmeldung (DE) P 4020 607.6 sind Fusionsproteine bestehend aus verschiedenen Anteilen der extrazellulären Domänen menschlicher Membranproteine oder löslicher Proteine (Fusionspartner) und dem konstanten Teil (Fc) der schweren Kette eines

Ig bekannt bzw. vorgeschlagen. Hierbei wird auf DNA-Ebene die kodierende Sequenz des Fusionspartners mit einer für den Fc-Teil kodierenden DNA derart fusioniert, daß der Fusionspartner vorzugsweise den aminoterminalen Anteil des Fusionsproteins ausmacht. Die rekombinante DNA wird dann in geeigneten Zellsystemen exprimiert. Fusionspartner für den Fc-Teil sind einerseits zur Immunglobulinfamilie gehörige Proteine wie das T-Zellantigen CD4 (EP-A 0325 262 und 0314 317), andererseits auch strukturell nicht verwandte Proteine wie Thromboplastin oder der Rezeptor für Interleukin-4 (IL-4) (DE P 4020607.6). Die genannten Fusionsproteine werden vorzugsweise in Animalzellen exprimiert. Der aminoterminal Fusionspartner behält in der Regel seine biologische Aktivität; stammt er beispielsweise von einem normalerweise membranständigen Rezeptorprotein, bindet er Liganden mit einer Affinität, die der des membrangebundenen Rezeptors gleichkommt. Ist also ein Rezeptor-Protein auf cDNA-Ebene charakterisiert, besteht prinzipiell die Möglichkeit, in rekombinanten Expressionssystemen große Mengen biologisch aktiver Moleküle herzustellen. Diese können dann, wie unten beschrieben, in einem Bindungstest eingesetzt werden. In Animalzellen werden die beschriebenen Fusionsproteine sezerniert und können leicht affinitätschromatographisch aus dem Kulturüberstand gereinigt werden, da sie über ihren Fc-Teil an Protein A binden, das seinerseits an z. B. Sepharose gekoppelt werden kann. Die Synthese der Fusionsproteine kann auch in bekannten prokaryontischen Expressionssystemen (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus* etc.) bzw. Hefen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) unter Verwendung bekannter geeigneter Expressionsvektoren erfolgen. Neben dem beschriebenen und für die Erfindung bevorzugten Fc-Teil (Träger) können Fusionspartner erfindungsgemäß auch an beliebige andere Trägerproteine (z. B. Albumin, Protein A, Protein G, Glutathion-S-Transferase, *Staphylococcus aureus* Nuklease) gekoppelt werden.

Zur Durchführung der erfindungsgemäßen Rezeptorbindungsteste wird zunächst ein gegen den Träger-Teil gerichtetes Antiserum (oder monoklonaler Antikörper) oder ein anderes geeignetes Agens zur Beschichtung einer Festphase, z. B. einer ELISA-Testplatte, verwendet. Da bevorzugt der Fc-Teil eines Antikörpers und besonders bevorzugt der Fc-Teil eines humanen IgG1 als Träger eingesetzt wird, wird vorzugsweise ein spezifisch gegen die CH2-Domäne eines menschlichen IgG1 gerichtetes Kaninchenserum verwendet. An die vorbeschichtete Festphase werden dann die Fusionsproteine über ihren Träger-Teil gebunden.

Somit bleiben die auf dem Rezeptoranteil lokalisierten Bindungsstellen für Liganden zugänglich. Um nun den gebundenen Liganden nachweisen zu

können, muß dieser markiert sein. Dies kann z. B. durch Einführung eines radioaktiven Nuklids geschehen (z. B. Siekierka, J.J. und DeGudicibus, S., Anal. Biochem. Bd 172 (1988), 514-517), vorzugsweise jedoch durch Biotinylierung des Liganden (King und Catino, Anal.Biochem. Bd. 188 (1990), 97-100). Dieser wird dann seinerseits durch ein Streptavidin-Enzymkonjugat, vorzugsweise Streptavidin-Peroxidase, nachgewiesen. Der prinzipielle Aufbau der erfindungsgemäßen Tests ist in Fig. 1 beispielhaft dargestellt.

Die erfindungsgemäßen Tests haben breite Verwendungsmöglichkeiten, von denen die bevorzugten nachstehend aufgeführt sind und ebenfalls die Erfindung ausmachen:

- Verwendung im "Rezeptorscreening":
 - a) Rezeptor in der Festphase: Screening einer großen Anzahl von Substanzen zur Identifizierung von Agonisten und Antagonisten des Liganden.
 - b) Ligand in der Festphase: Screening einer großen Anzahl von Substanzen zur Identifizierung von Agonisten und Antagonisten des Rezeptors.
- Verwendung im Antikörperscreening: Identifizierung von Antikörpern, die die Wechselwirkung von Ligand und Rezeptor beeinflussen.
- Verwendung zum quantitativen Nachweis der Bindungsaktivität von löslichen Rezeptorformen.
- Verwendung zum quantitativen Nachweis der biologischen Aktivität spezifischer Liganden.
- Funktionelle Analyse von veränderten Liganden ("Muteinen") oder Teilen (z. B. Oligopeptiden) davon.
- Identifizierung von Substanzen, die die Wechselwirkung pathogener Organismen (z. B. Viren oder Bakterien) mit ihren zellulären Rezeptoren beeinflussen.
- Identifizierung von Substanzen, die die Wechselwirkung zellulärer Adhäsionsmoleküle beeinflussen.

Die Erfindung ist ferner in den Beispielen näher erläutert und in den Patentansprüchen enthalten.

Beispiel 1:

Zellfreier IL-4 Bindungstest

Aus der DE P 4020 607.6 ist das Protein IL-4RfC bekannt. Es besteht aus dem extrazellulären Anteil des menschlichen Rezeptors für IL-4, der an den Fc-Teil der schweren Kette eines humanen IgG1-Moleküls fusioniert ist. ELISA-Testplatten (Nunc, Typ B) wurden über Nacht bei 4°C mit 100 µl eines affinitätsgereinigten Kaninchenserums ge-

gen die CH2-Domäne von menschlichem IgG (Dakopatts) beschichtet. Die Konzentration betrug 10 µg/ml in PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.1 mM Na2HPO4, 3.9 mM KH2PO4, 0.5 mM MgCl2, 0.1 mM CaCl2, pH 7.0). Nach fünfmaligem Waschen mit PBS enthaltend 0.05 % Tween 20 wurde die Testplatte mit 275 µl PBS enthaltend 5 % Trockenmagermilch 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach wie oben gewaschen. Es wurde dann zunächst eine "Schachbrett-titration" vorgenommen, um eine geeignete Kombination von Rezeptor- und Ligandenkonzentrationen für den Aufbau des Tests zu bestimmen. Hierzu wurde die Testplatte zunächst mit verschiedenen Konzentrationen an gereinigtem IL-4RfC-Protein (100 µl) in Eagle's Medium (modifiziert nach Dulbecco) enthaltend 10 % fötales Kälberserum (DMEM/FKS) 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach wie oben gewaschen. IL-4 wurde mittels N-Hydroxysuccinimid-Biotin (Sigma) biotinyliert (Niendorf, A. et al., J. Histochem. Cytochem. Bd. 34 (1986), 357-361) und in verschiedenen Konzentrationen in DMEM/FKS (100 µl) ebenfalls 60 min bei Raumtemperatur an die IL-4RfC-vorinkubierte Testplatte gebunden. Nach Waschen wie oben wurde 30 min bei Raumtemperatur mit 100 µl Streptavidin-Peroxidase (Amersham; 1:250 in DMEM/FKS) inkubiert und danach wie oben gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Peroxidase geschah durch Farbentwicklung in 100 µl Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Behringwerke). Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 450 nm gemessen. Die Ergebnisse des Versuches sind in Fig. 2 dargestellt. Abhängig von den eingesetzten Mengen an Rezeptor und Ligand wird eine Anzahl typischer Bindungskurven erhalten. Das Signal, das den gebundenen Liganden reflektiert, erreicht einen Plateauwert, der umso höher liegt, je mehr Rezeptor zur Beschichtung der Testplatte eingesetzt wurde. Für weitergehende Versuche mit den in Fig. 1 schematisch dargestellten Kompetitionstests wurde eine Kombination von 300 ng/ml IL-4RfC zur Beschichtung und 300 ng/ml IL-4-Biotin für die Bindung verwendet. Zur Konzentrationsberechnung von IL-4-Biotin wie auch der in den Beispielen 3 und 5 aufgeführten Liganden wurde angenommen, daß aller zur Biotinylierung eingesetzter Ligand auch tatsächlich zurückerhalten wurde. Die verwendete Kombination ergibt ein Signal (ca. 2000 mE), das (i) deutlich zu messen ist und (ii) noch vor Erreichen des Plateauwertes für die verwendete Rezeptorkonzentration liegt. Um Spezifität und Sensitivität des Tests zu bestimmen, wurde untersucht, inwieweit verschiedene Liganden mit IL-4-Biotin um die Bindung an IL-4RfC kompetieren können (Fig. 3). Hierzu wurde eine konstante Konzentration (300 ng/ml) IL-4-Biotin in Gegenwart ver-

schiedener Konzentrationen an IL-1-alpha, IL-3 und IL-4 eingesetzt. Fig. 3 zeigt, daß nur IL-4 wirksam kompetieren kann, während IL-1-alpha und IL-3 in den eingesetzten Konzentrationen keine Bindungsaktivität zeigen. Die Konzentration an IL-4, bei der eine halbmaximale Inhibition der Bindung von IL-4-Biotin beobachtet wird (IC₅₀), liegt bei 1 ng/ml.

Beispiel 2:

Nachweis löslichen IL-4 Rezeptors im zellfreien Bindungstest

Es sollte gezeigt werden, ob mit dem Test nicht nur kompetierende Liganden nachgewiesen werden können, sondern auch rekombinante lösliche Formen von Rezeptoren. Hierzu wurde das IL-4R₁Fc-Protein selbst gewählt. Der Testaufbau war wie in Beispiel 1 beschrieben, es wurden jedoch nach Inkubation der Testplatte mit der Standardkonzentration IL-4R₁Fc (300 ng/ml) verbleibende freie Fc-Bindungsstellen durch Inkubation mit 10% Humanserum in DMEM/FKS (60 min bei Raumtemperatur) abgesättigt. Danach wurde der Bindungstest in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von IL-4R₁Fc durchgeführt. Fig. 4 zeigt, daß IL-4R₁Fc in diesem Kompetitionstest tatsächlich nachgewiesen werden kann, während IL-7R₁Fc, eine Fc-Fusion des humanen IL-7-Rezeptors, keine Bindungsaktivität aufweist. Die IC₅₀ für IL-4R₁Fc liegt bei 250 ng/ml.

Beispiel 3:

Zellfreier TNF Bindungstest

cDNA für die 80 kD-Form des menschlichen TNF-Rezeptors wurde kürzlich isoliert (Smith, C. A. et al., Science, Bd. 248 (1990), 1019-1023). Sie kodiert für ein typisches Membranprotein bestehend aus der aminoterminalen extrazellulären Domäne, einer Transmembranregion und einer carboxyterminalen cytoplasmatischen Domäne. In der kodierenden Region für den TNF-Rezeptor liegt direkt vor den Kodons für die letzten fünf Aminosäurereste der extrazellulären Region eine singuläre Schnittstelle für das Restriktionsenzym PvuII. Das die cDNA enthaltende Expressionsplasmid huTNFRcavnot wurde mit PvuII geschnitten und mit BamHI-Linkern (5' CGGATCCG 3') ligiert. Danach wurde mit NotI gespalten, das direkt vor der 5'-untranslatierten Region des TNF-Rezeptors schneidet. Der entstehende Überhang wurde mittels Klenow-Enzym aufgefüllt und danach eine Spaltung mit BamHI durchgeführt. Das erhaltene NotI (aufgefüllt)/BamHI-Fragment (~ 800 bp) kodiert für die gesamte extrazelluläre Domäne des TNF-Rezeptors (mit Ausnahme der fünf Aminosäurereste

direkt vor der Transmembranregion) mit einem durchgehenden Leserahmen vom Initiationskodon bis zu der in der BamHI-Erkennungssequenz enthaltenen Nukleotidfolge GAT, die in diesem Leserahmen für einen Asparaginsäurerest kodiert. Dieses Fragment wurde in den aus der DE P 4020607.6 bekannten Vektor p4EGammaH kloniert. Hierzu wurde p4EGammaH mit HindIII und nach Auffüllung des entstehenden Überhangs mittels Klenow-Enzym mit BamHI geschnitten. Das erhaltene Expressionsplasmid pTNFRFc kodiert für das Fusionsprotein TNFRFc aus dem extrazellulären Anteil des TNF-Rezeptors, der über die Hinge-Region an den Fc-Teil der schweren Kette eines menschlichen IgG1 gekoppelt ist. pTNFRFc ist schematisch in Fig. 5, die Aminosäuresequenz des darin kodierten TNFRFc in Fig. 6 dargestellt. pTNFRFc wurde in BHK-Zellen transfiziert und stabile Klone wurden nach Doppelselektion mit Methotrexat und G418 erhalten (EP-A 0330 977). Typische Expressionsraten lagen bei 20 µg/ml Überstand, aus dem TNFRFc mittels Chromatographie auf Protein A-Sepharose isoliert wurde (DE P 4020607.6). Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurde mit TNFRFc und biotinyliertem TNF-alpha zunächst eine Schachbrettiteration vorgenommen, um geeignete Bedingungen für einen Bindungstest zu definieren. Fig. 7 zeigt eine Serie von Bindungskurven, die in diesem Versuch erhalten wurden. Für weitere Versuche wurde die Kombination von 200 ng/ml TNFRFc zur Beschichtung und 20 ng/ml TNF-alpha-Biotin für die Bindung gewählt. Auch der TNF-Bindungstest ist sensitiv und spezifisch für TNF-alpha. In Fig. 8 ist das Ergebnis eines Kompetitionsversuchs dargestellt. Nur TNF-alpha hemmt Bindung von TNF-alpha-Biotin mit einer IC₅₀ von 5 ng/ml, während IL-1-alpha, IL-3, IL-4 und GM-CSF in den verwendeten Konzentrationen keinen Effekt zeigen.

Beispiel 4:

Nachweis löslichen TNF-Rezeptors im zellfreien Bindungstest

Dieser Versuch wurde analog zu dem im Beispiel 2 beschriebenen durchgeführt (Fig. 9). TNFRFc hemmt mit einer IC₅₀ von 35 ng/ml, während IL-1R₁Fc, ein Fusionsprotein aus dem humanen IL-1-Rezeptor und dem Fc-Teil eines menschlichen IgG1, nicht inhibiert.

Beispiel 5:

Zellfreier GM-CSF Bindungstest

cDNA für einen humanen Rezeptor für GM-CSF wurde isoliert (Gearing, D.P. et al., EMBO J.

Bd. 8 (1989), 3667-3676). Auch der GM-CSF-Rezeptor ist ein typisches Membranprotein mit aminoterminaler extrazellulärer Domäne, Transmembranregion und carboxyterminaler intrazellulärer Domäne. Zwei Oligonukleotide wurden synthetisiert, die mit Regionen in der 5'-untranslatierten Region (Oligonukleotid

A: 5'AGCAGGTGGAAGGAGAGGAAGCGG 3') bzw. 3'-untranslatierten Region (Oligonukleotid B: 5'AAGAAATGGGAACAGGCAGGCCTGGGC 3') hybridisieren können. Amplifizierung der Plasmid-DNA einer cDNA-Genbank von humaner Plazenta (Simmons, D. und Seed, B., Nature Bd. 333 (1988), 568-570) mit thermostabiler Taq-DNA-Polymerase ergab ein DNA-Fragment (ca. 1400 bp), das in seiner Größe der GM-CSF-Rezeptor-cDNA entspricht. Restriktionsanalysen bestätigten die Identität des amplifizierten DNA-Fragmentes. Nach Ligation von BstXI-Adaptoren (Aruffo, A. und Seed, B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Bd. 84, 8573-8577) wurde das Fragment in den BstXI-behandelten eukaryontischen Expressionsvektor CDM8 (Seed, B., Nature Bd. 329 (1987), 840-842) eingesetzt. Das resultierende Plasmid pCDM8GM-CSFR ist schematisch in Fig. 10 dargestellt.

Um eine Fc-Fusion mit GM-CSF-Rezeptor herstellen zu können, wurde eine erneute DNA-Amplifizierung mit thermostabiler Taq-DNA-Polymerase an pCDM8 durchgeführt.

Hierzu wurden zwei weitere Oligonukleotide synthetisiert. Oligonukleotid C (5'GATCGATTAAGCTTAGCAGGTGGAAGGAGAGGAAGCGGATGCCG 3') hybridisiert mit der 5'-untranslatierten Region und führt vor dieser eine HindIII-Schnittstelle ein, Oligonukleotid D (5'GCCATTGAATTTGGTTCTGAGGATCCAGATATGC 3') hybridisiert mit der cDNA vor der kodierenden Region für die Transmembrandomäne und führt direkt vor dieser eine BamHI-Schnittstelle ein. Das erwartete 1131 bp-Fragment wurde erhalten und nach Behandlung mit BamHI und HindIII in den BamHI/HindIII-geschnittenen Vektor p4EGammaH eingeführt. Das so erzeugte Expressionsplasmid pGM-CSFRFc kodiert für das Fusionsprotein GM-CSFRFc bestehend aus der extrazellulären Domäne des GM-CSF-Rezeptors, die über die Hinge-Region an den Fc-Teil eines menschlichen IgG1 gekoppelt ist. pGM-CSFRFc und die Peptidsequenz des Fusionsproteins GM-CSFRFc sind in Fig. 11 bzw. 12 dargestellt.

pGM-CSFRFc wurde transient in COS-Zellen exprimiert. Hierzu wurden COS-Zellen mit Hilfe von DEAE-Dextran mit pGM-CSFRFc transfiziert (EP-A 0325 262). Die Überstände wurden für den zellfreien GM-CSF-Bindungstest verwendet.

Fig. 13 zeigt das Ergebnis der Schachbretttitration mit GM-CSFRFc und biotinyliertem GM-CSF. Für weitere Versuche wurde die Kombination 1000

ng/ml GM-CSFRFc zur Beschichtung und 150 ng/ml GM-CSF-Biotin für die Bindung gewählt.

Der Bindungstest ist spezifisch für GM-CSF. Unter den gewählten Bedingungen hemmt unmarkiertes GM-CSF die Bindung von GM-CSF-Biotin mit einer IC₅₀ von 200 ng/ml, während TNF-alpha, G-CSF, IL-1-alpha, IL-3 und IL-4 in den verwendeten Konzentrationen nicht inhibieren (Fig.14).

Beispiel 6:

Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen GM-CSF im zellfreien Rezeptorbindungstest

Es wurde eine Reihe verschiedener monoklonaler Antikörper gegen GM-CSF hergestellt (Behringwerke). Sie wurden gleichzeitig mit GM-CSF-Biotin im Bindungstest eingesetzt unter den in Beispiel 5 beschriebenen Bedingungen (Fig. 15).

Der monoklonale Antikörper 699/779 hemmt die Bindung, ist also mit hoher Wahrscheinlichkeit gegen ein Rezeptor-Bindungssepitop auf GM-CSF gerichtet. Die monoklonalen Antikörper 691/A40, 799/3, 3.G11, 932/453 sowie der Kontrollantikörper BMA031 (gerichtet gegen einen humanen T-Zellrezeptor) hingegen inhibieren nicht. 932/453 und in geringerem Maße auch 691/A40 bewirken sogar eine Erhöhung des gemessenen Signals.

Legenden zu den Abbildungen

Legende zu Fig. 1:

Prinzipieller Aufbau des zellfreien Rezeptorbindungstests:

A) Ein Rezeptor/Träger-Fusionsprotein (3) wird über einen Anti-Träger-Antikörper (4) oder ein anderes geeignetes Agens an eine Festphase gebunden. An die Rezeptor-Bindungsstelle kann ein markierter Ligand (2) binden, der seinerseits über ein Nachweis/Amplifikationssystem (1) gemessen werden kann.

B) Ein unmarkierter Ligand des Rezeptors kann über die Konkurrenz für die Rezeptorbindungsstelle nachgewiesen werden.

c) Löslicher Rezeptor kann über die Konkurrenz für den markierten Liganden nachgewiesen werden.

Legende zu Fig. 2:

Zellfreier IL-4-Bindungstest: Abhängigkeit der IL-4-Biotin-Bindung von der zur Beschichtung der ELISA-Testplatte verwendeten IL-4RFc-Konzentration.

Legende zu Fig. 3:

Zellfreier IL-4-Bindungstest:

Abhängigkeit der IL-4-Biotin-Bindung von der Konzentration der zur Konkurrenz eingesetzten Liganden.

Legende zu Fig. 4:

Zellfreier IL-4-Bindungstest:

Abhängigkeit der IL-4-Biotin-Bindung von der Konzentration der zur Konkurrenz eingesetzten Rezeptor/Fc-Fusionsproteine.

Legende zu Fig. 5:

Schematischer Aufbau des Expressionsplasmids pTNFRFc.

Legende zu Fig. 6:

Aminosäuresequenz des Fusionsproteins TNFRFc.

Legende zu Fig. 7:

Zellfreier TNF-alpha-Bindungstest:

Abhängigkeit der TNF-alpha-Biotin-Bindung von der zur Beschichtung der ELISA-Testplatte verwendeten TNFRFc-Konzentration.

Legende zu Fig. 8:

Zellfreier TNF-alpha-Bindungstest:

Abhängigkeit der TNF-alpha-Biotin-Bindung von der Konzentration der zur Konkurrenz eingesetzten Liganden.

Legende zu Fig. 9:

Zellfreier TNF-alpha-Bindungstest:

Abhängigkeit der TNF-alpha-Biotin-Bindung von der Konzentration der zur Konkurrenz eingesetzten Rezeptor/Fc-Fusionsproteine.

Legende zu Fig. 10:

Schematischer Aufbau des Expressionsplasmids pCDM8GM-CSFR.

Legende zu Fig. 11:

Schematischer Aufbau des Expressionsplasmids pGM-CSFRFc.

Legende zu Fig. 12:

Aminosäuresequenz des Fusionsproteins GM-CSFRFc.

Legende zu Fig. 13:

Zellfreier GM-CSF-Bindungstest:

Abhängigkeit der GM-CSF-Biotin-Bindung von der zur Beschichtung der ELISA-Testplatte verwendeten GM-CSFRFc-Konzentration.

Legende zu Fig. 14:

Zellfreier GM-CSF-Bindungstest:

Abhängigkeit der GM-CSF-Biotin-Bindung von der Konzentration der zur Konkurrenz eingesetzten Liganden.

Legende zu Fig. 15:

Zellfreier GM-CSF-Bindungstest:

Abhängigkeit der GM-CSF-Biotin-Bindung von der Konzentration der im Bindungstest eingesetzten anti-GM-CSF-Antikörper.

Patentansprüche

1. Bindungstest enthaltend

- (1) ein rekombinantes Fusionsprotein (Bindungspartner I), aus einem für die zu untersuchende Bindung relevanten Fusionspartner und einem Trägerprotein
- (2) wobei dieses Fusionsprotein mittels geeigneter Agenzien, vorzugsweise eines Anti-

serums oder monoklonalen Antikörpers, unter Beibehaltung der Bindungsaktivität des Fusionspartners an eine geeignete Festphase gekoppelt ist, und

(3) der andere Bindungspartner II in einer für die Messung der Bindung geeignete Weise markiert ist.

2. Bindungstest nach Anspruch 1, in dem der Fusionspartner im rekombinanten Fusionsprotein die extrazelluläre Domäne eines zellulären Rezeptors oder Teile davon ist.

3. Bindungstest nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor ein Cytokinrezeptor ist.

4. Bindungstest nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor ein Wachstumsfaktorrezeptor ist.

5. Bindungstest nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor ein Hormonrezeptor ist.

6. Bindungstest nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor ein Neurotransmitterrezeptor ist.

7. Bindungstest nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor der Rezeptor für einen pathogenen Organismus oder Teile davon ist.

8. Bindungstest nach Anspruch 1, in dem der Fusionspartner im rekombinanten Fusionsprotein die extrazelluläre Domäne eines Zelladhäsionsmoleküls oder Teil davon ist.

9. Bindungstest nach Anspruch 1, in dem der Fusionspartner im rekombinanten Fusionsprotein ein lösliches Protein oder Teil davon ist.

10. Bindungstest nach Anspruch 1, in dem das Trägerprotein im rekombinanten Fusionsprotein ein Immunglobulinmolekül oder Teil davon ist.

11. Bindungstest nach Anspruch 10, in dem das Trägerprotein im rekombinanten Fusionsprotein der konstante Teil der schweren Kette eines Immunglobulins oder Teil davon ist.

12. Bindungstest nach Ansprüchen 10 und 11, in dem das Trägerprotein im rekombinanten Fusionsprotein der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG 1 oder Teil davon ist.

13. Bindungstest nach Anspruch 1 unter Verwendung eines Trägerproteins im rekombinanten Fusionsprotein, welches die biologische Aktivi-

tät des Fusionspartners nicht beeinflußt und das Fusionsprotein einer Reinigung über Affinitätschromatographie zugänglich macht.

14. Bindungstest nach Ansprüchen 1 bis 13, in dem der Bindungspartner (II) ein natürlicher oder künstlicher Ligand des Fusionspartners nach Ansprüchen 2 bis 9 ist. 5
15. Bindungstest nach Ansprüchen 1 bis 14, in dem der Bindungspartner (II) radioaktiv markiert wird und so nachgewiesen werden kann. 10
16. Bindungstest nach Ansprüchen 1 bis 14, in dem der Bindungspartner (II) mit einem niedermolekularen Liganden (wie z.B. Biotin) verknüpft wird und so in einem weiteren Reaktionsschritt nachgewiesen werden kann. 15
17. Bindungstest nach Ansprüchen 1 bis 14, in dem der Bindungspartner (II) mit einem enzymatisch aktiven Protein (z.B. Peroxidase, Alkalische Phosphatase, Luciferase) verknüpft wird und so nachgewiesen werden kann. 20
18. Bindungstest nach Anspruch 16, in dem für den weiteren Reaktionsschritt an Peroxidase gekoppeltes Streptavidin verwendet wird. 25
19. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 für Rezeptorscreening zur Identifizierung natürlicher oder synthetischer Agonisten oder Antagonisten der jeweiligen Wechselwirkung. 30
20. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zur Charakterisierung von Antikörpern gerichtet gegen einen der beiden Bindungspartner. 35
21. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zum Nachweis der biologischen Aktivität löslicher zellulärer Rezeptoren. 40
22. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zum Nachweis der biologischen Aktivität von Liganden. 45
23. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zur funktionellen Analyse gezielt veränderter Liganden oder Teilen davon. 50
24. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zur Identifizierung von diagnostisch oder therapeutisch relevanten Substanzen. 55
25. Verfahren zur Identifizierung natürlicher oder

synthetischer Agonisten oder Antagonisten der jeweiligen Wechselwirkung, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 zum Rezeptorscreening eingesetzt werden.

26. Verfahren zur Charakterisierung von Antikörpern, die gegen einen von zwei Bindungspartnern gerichtet sind, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.
27. Verfahren zum Nachweis der biologischen Aktivität von löslicher zellulärer Rezeptoren, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.
28. Verfahren zum Nachweis der biologischen Aktivität von Liganden, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.
29. Verfahren zur funktionellen Analyse gezielt veränderter Liganden oder Teilen davon, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.
30. Verfahren zur Identifizierung von diagnostisch oder therapeutisch relevanten Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.
31. Verfahren zur Herstellung eines Bindungstests nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes Fusionsprotein (Bindungspartner I) aus einem für die zu untersuchende Bindung relevanten Fusionspartner und einem Trägerprotein mittels geeigneter Agenzien, vorzugsweise eines Antiserums oder monoklonalen Antikörpers, unter Beibehaltung der Bindungsaktivität des Fusionspartners an eine geeignete Festphase gekoppelt wird, wobei der andere Bindungspartner II in einer für die Messung der Bindung geeigneten Weise markiert ist.

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : ES, GR

1. Verfahren zur Herstellung eines Bindungstests, dadurch gekennzeichnet, daß
 - (1) ein rekombinantes Fusionsprotein (Bindungspartner I) aus einem Trägerprotein mittels geeigneter Agenzien, vorzugsweise eines Antiserums oder monoklonalen Antikörpers, unter Beibehaltung der Bindungsaktivität des Fusionspartners an eine geeignete Festphase gekoppelt wird, und

(2) der andere Bindungspartner II in einer für die Messung der Bindung geeignete Weise markiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, in dem der Fusionspartner im rekombinanten Fusionsprotein die extrazelluläre Domäne eines zellulären Rezeptors oder Teile davon ist. 5
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor ein Cytokinrezeptor ist. 10
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor ein Wachstumsfaktorrezeptor ist. 15
5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor ein Hormonrezeptor ist.
6. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor ein Neurotransmitterrezeptor ist. 20
7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der zelluläre Rezeptor der Rezeptor für einen pathogenen Organismus oder Teile davon ist. 25
8. Verfahren nach Anspruch 1, in dem der Fusionspartner im rekombinanten Fusionsprotein die extrazelluläre Domäne eines Zelladhäsionsmoleküls oder Teil davon ist. 30
9. Verfahren nach Anspruch 1, in dem der Fusionspartner im rekombinanten Fusionsprotein ein lösliches Protein oder Teil davon ist.
10. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Trägerprotein im rekombinanten Fusionsprotein ein Immunglobulinmolekül oder Teil davon ist. 35
11. Verfahren nach Anspruch 10, in dem das Trägerprotein im rekombinanten Fusionsprotein der konstante Teil der schweren Kette eines Immunglobulins oder Teil davon ist. 40
12. Verfahren nach Ansprüchen 10 und 11, in dem das Trägerprotein im rekombinanten Fusionsprotein der konstante Teil der schweren Kette von humanem IgG 1 oder Teil davon ist. 45
13. Verfahren nach Anspruch 1 unter Verwendung eines Trägerproteins im rekombinanten Fusionsprotein, welches die biologische Aktivität des Fusionspartners nicht beeinflußt und das Fusionsprotein einer Reinigung über Affinitätschromatographie zugänglich macht. 50
14. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 13, in dem der Bindungspartner (II) ein natürlicher oder künstlicher Ligand des Fusionspartner nach 55

Ansprüchen 2 bis 9 ist.

15. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 14, in dem der Bindungspartner (II) radioaktiv markiert wird und so nachgewiesen wird.
16. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 14, in dem der Bindungspartner (II) mit einem niedermolekularen Liganden (wie z.B. Biotin) verknüpft wird und so in einem weiteren Reaktionsschritt nachgewiesen werden kann.
17. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 14, in dem der Bindungspartner (II) mit einem enzymatisch aktiven Protein (z.B. Peroxidase, Alkalische Phosphatase, Luciferase) verknüpft wird und so nachgewiesen werden kann.
18. Verfahren nach Anspruch 16, in dem für den weiteren Reaktionsschritt an Peroxidase gekoppeltes Streptavidin verwendet wird.
19. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 für Rezeptorscreening zur Identifizierung natürlicher oder synthetischer Agonisten oder Antagonisten der jeweiligen Wechselwirkung.
20. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zur Charakterisierung von Antikörpern gerichtet gegen einen der beiden Bindungspartner.
21. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zum Nachweis der biologischen Aktivität löslicher zellulärer Rezeptoren.
22. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zum Nachweis der biologischen Aktivität von Liganden.
23. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zur funktionellen Analyse gezielt veränderter Liganden oder Teilen davon.
24. Verwendung des Bindungstests nach Ansprüchen 1 bis 18 zur Identifizierung von diagnostisch oder therapeutisch relevanten Substanzen.
25. Verfahren zur Identifizierung natürlicher oder synthetischer Agonisten oder Antagonisten der jeweiligen Wechselwirkung, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 zum Rezeptorscreening eingesetzt werden.
26. Verfahren zur Charakterisierung von Antikörper-

pern, die gegen einen von zwei Bindungspartnern gerichtet sind, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.

5

27. Verfahren zum Nachweis der biologischen Aktivität von löslicher zellulärer Rezeptoren, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.

10

28. Verfahren zum Nachweis der biologischen Aktivität von Liganden, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.

15

29. Verfahren zur funktionellen Analyse gezielt veränderter Liganden oder Teilen davon, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.

20

30. Verfahren zur Identifizierung von diagnostisch oder therapeutisch relevanten Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß Bindungsteste nach Ansprüchen 1 bis 18 eingesetzt werden.

25

30

35

40

45

50

55

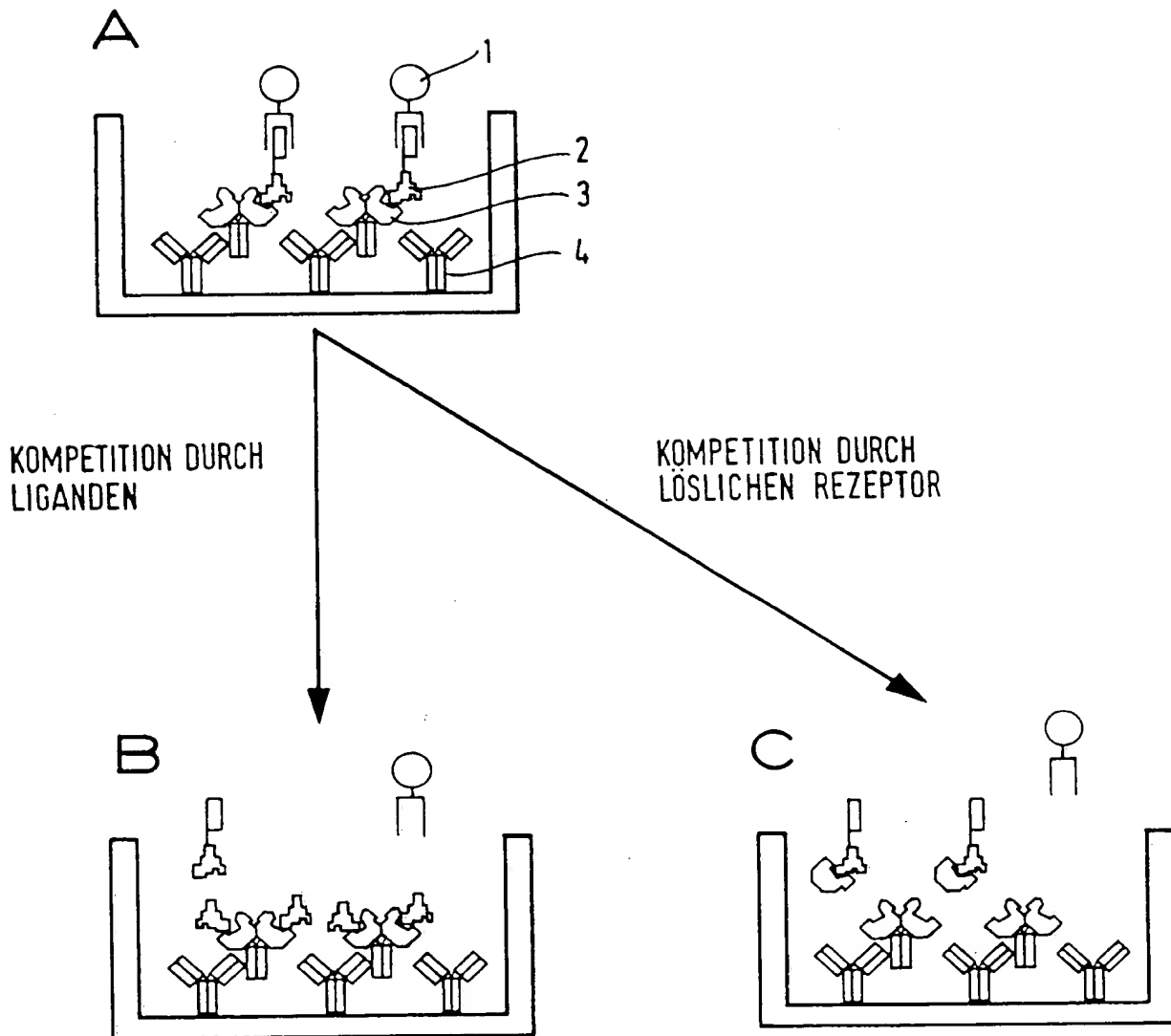
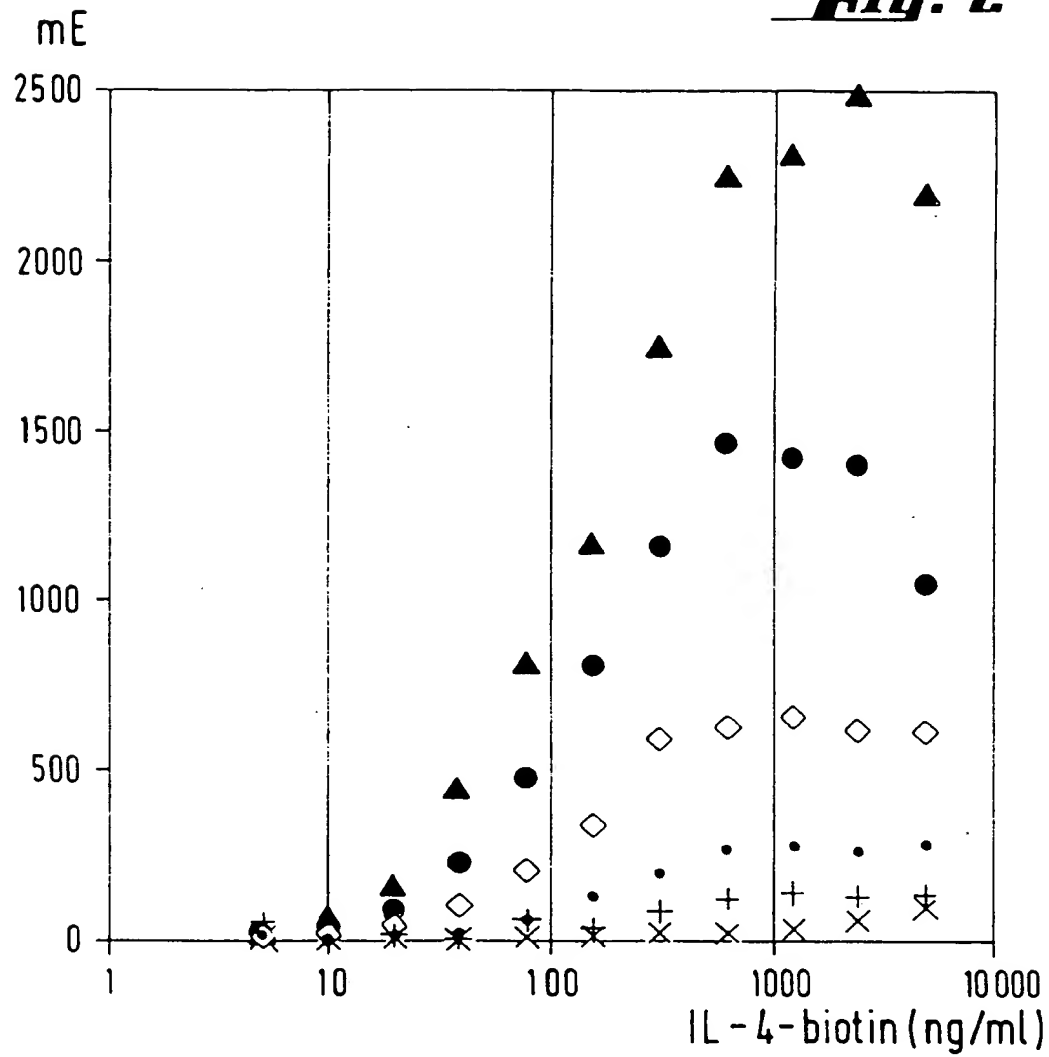
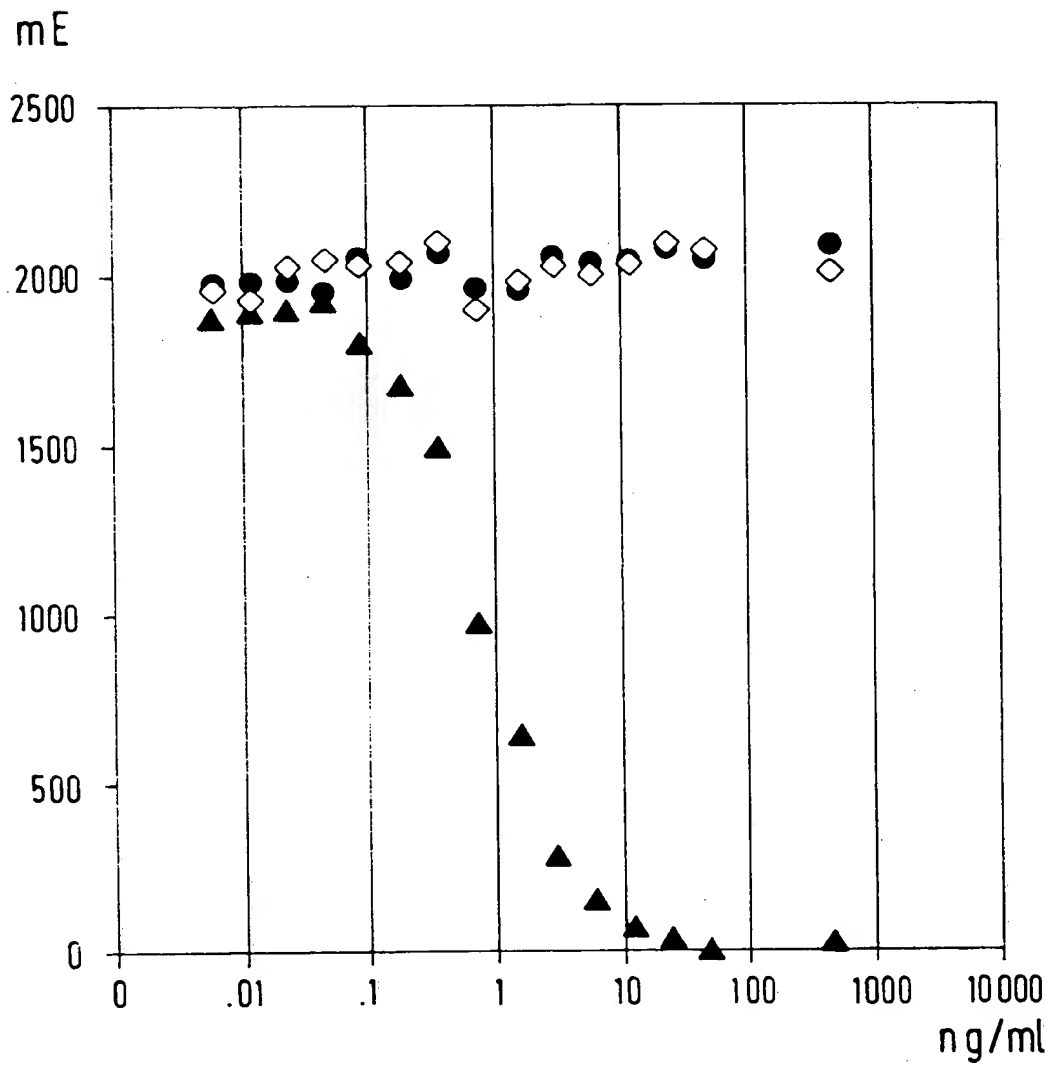


Fig. 1

Fig. 2

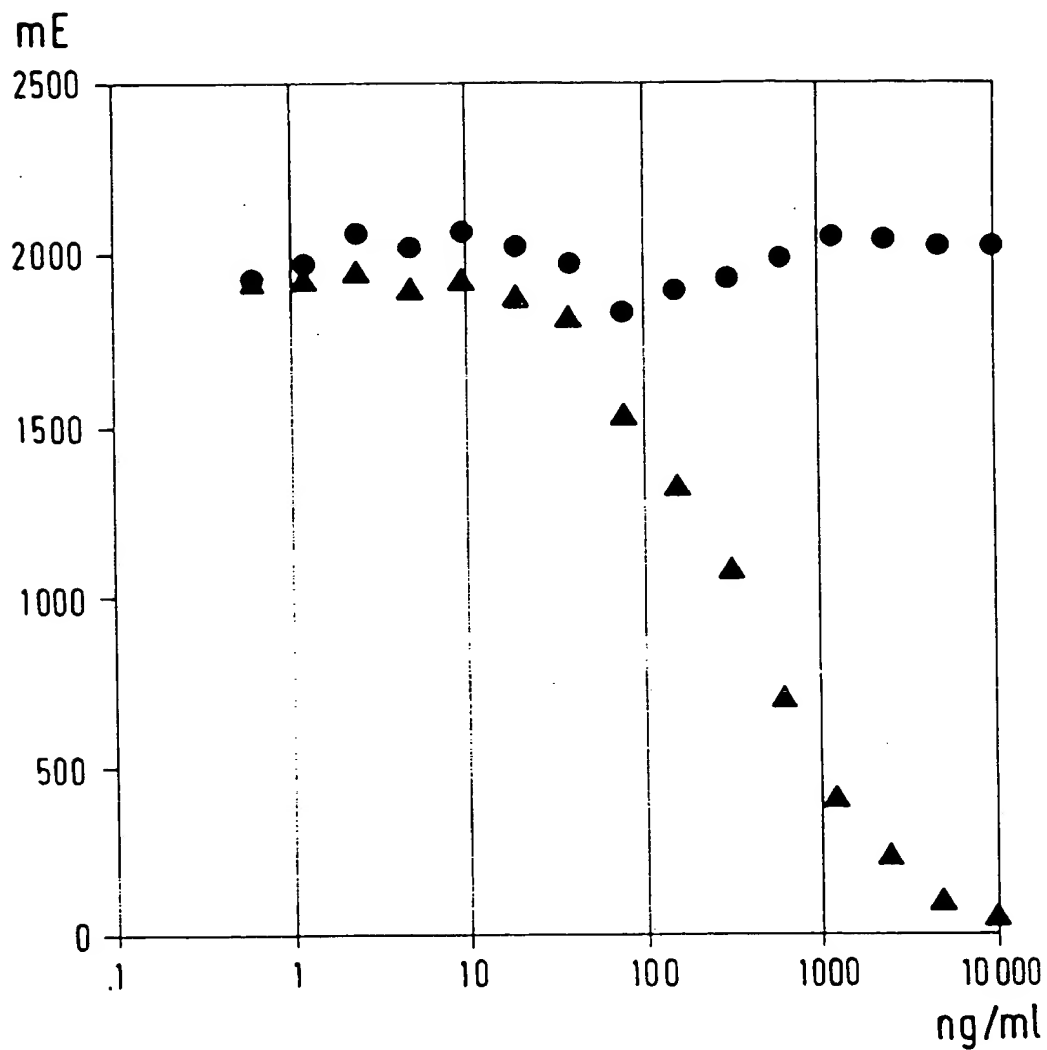
IL - 4RFc

- ▲ 300ng/ml
- 150ng/ml
- ◇ 75ng/ml
- 37,5ng/ml
- + 19ng/ml
- × 9,4ng/ml

Fig. 3

KOMPETITOR

- ▲ IL-4
- IL-1-alpha
- ◇ IL-3



KOMPETITOR
▲ IL-4Rfc
● IL-7Rfc

Fig. 4

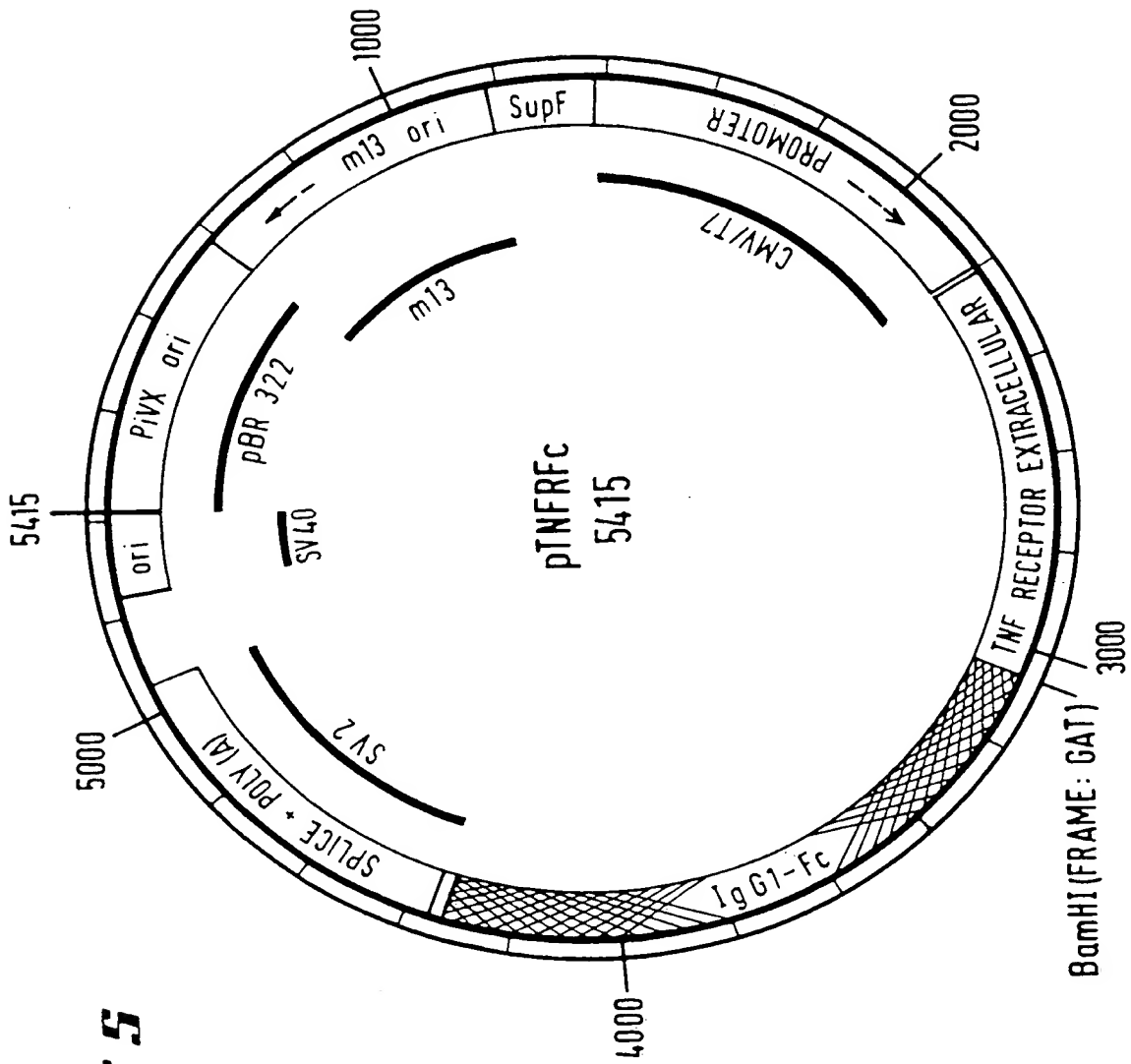


Fig. 5

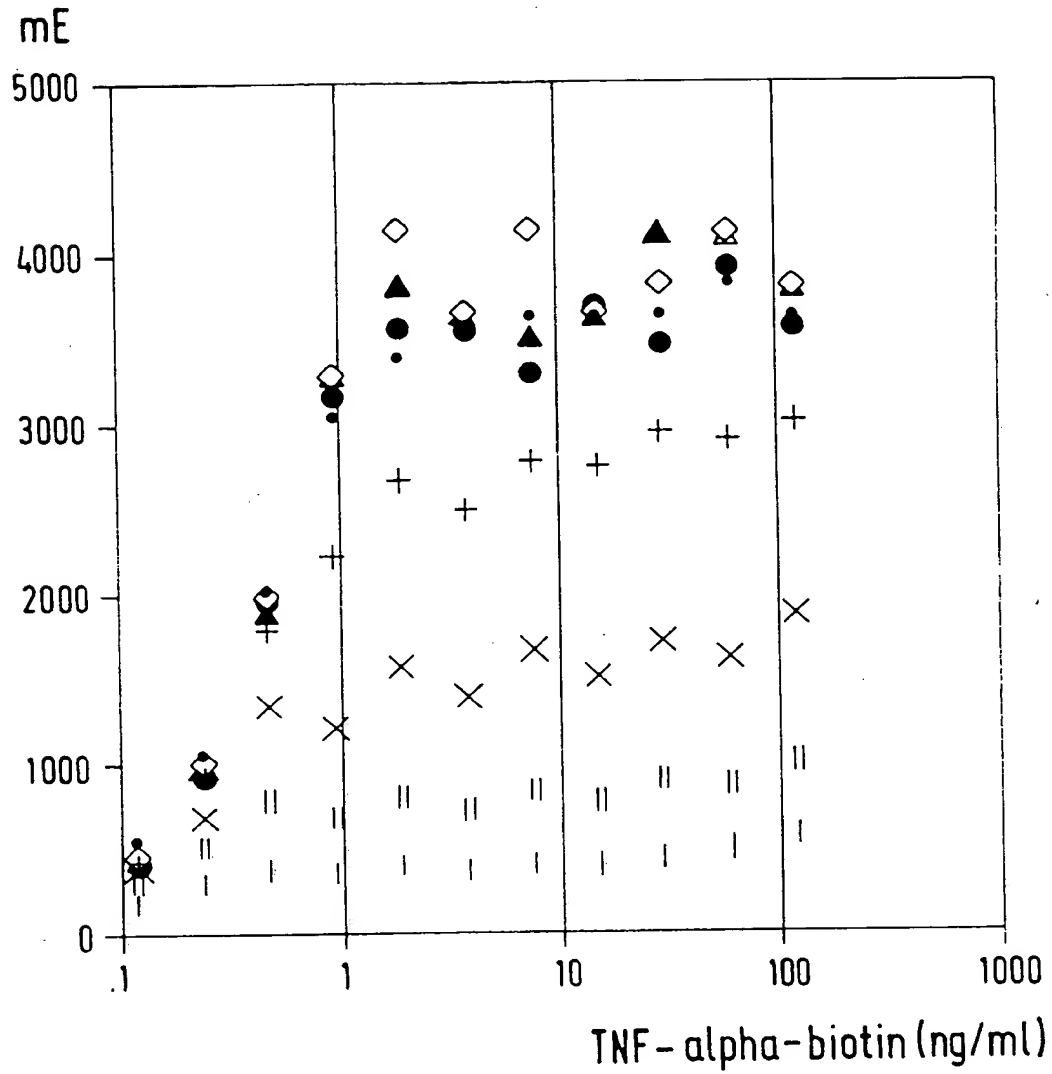
PRIMÄRSTRUKTUR VON TNFRFc

```

1  MAPVAVWAAL AVGLELWAAA HALPAQVAFT PYAPEPGSTC RLREYYDQTA
   |-----
51  QMCCSKCSPG QHAKVFCTKT SDTVCDSCED STYTQLWNWV PECLSCGSRC
   -----human TNF receptor-----
101 SSDQVETQAC TREQNRICTC RPGWYCALSQ QEGCRLCAPL RKCRPGFGVA
   -----(extracellular)-----
151 RPGTETSDVV CKPCAPGTFS NTTSSTDICR PHQICNVVAI PGNASMDAVC
   -----
201 TSTSPTRSMA PGAVHLPQPV STRSQHTQPT PEPSTAPSTS FLLPMGPSPV
   -----
251 AEDPEEPKSC DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT
   -||-linker und hinge| |-----
301 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH
   -----CH2-----
351 QWLNGKEYKC KVSNAKLPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN
   -----| |-----
401 QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT
   -----CH3-----
451 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK
   -----

```

Fig. 6

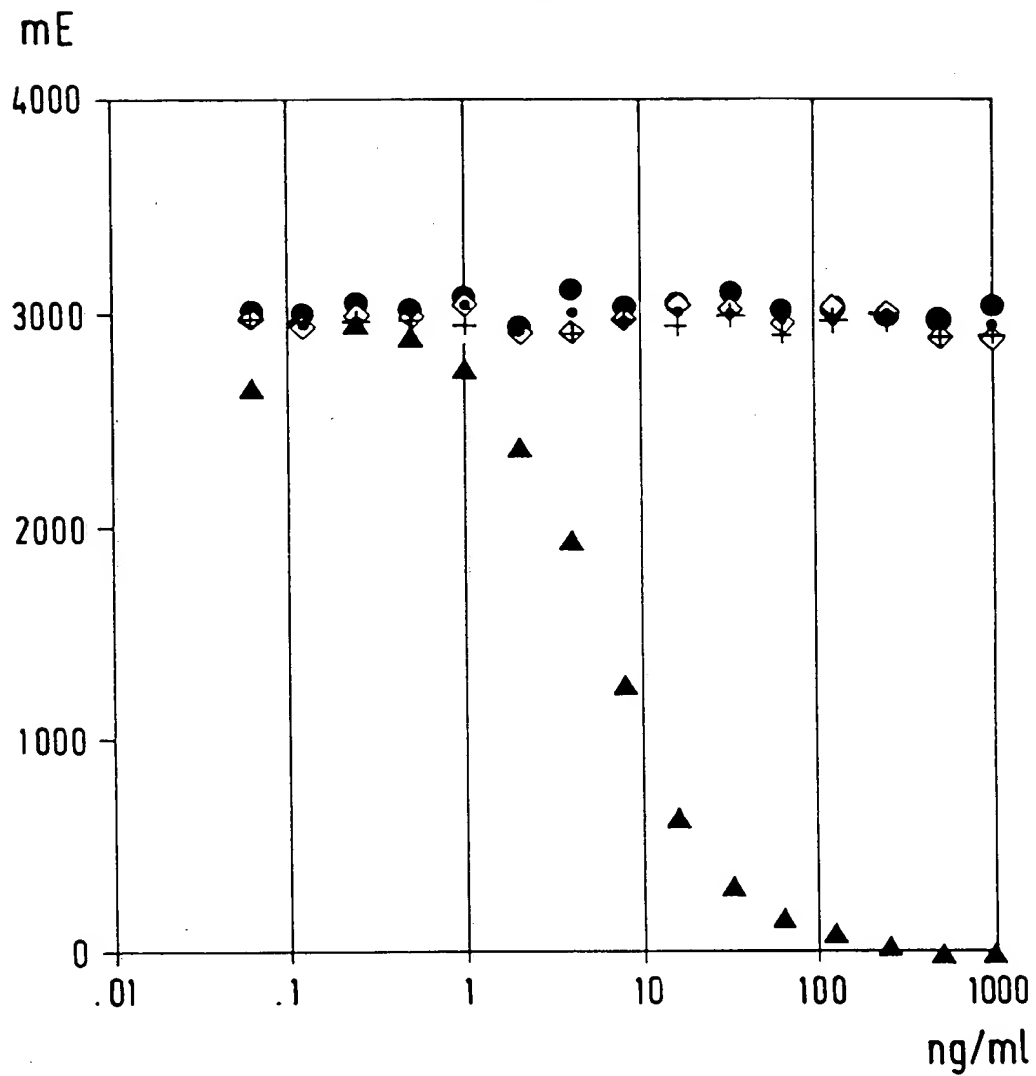


TNFRFc

- ▲ 2000 ng/ml
- 1000 ng/ml
- ◇ 500 ng/ml
- 250 ng/ml
- + 125 ng/ml
- × 62.5 ng/ml
- || 31.25 ng/ml
- | 15.6 ng/ml

Fig. 7

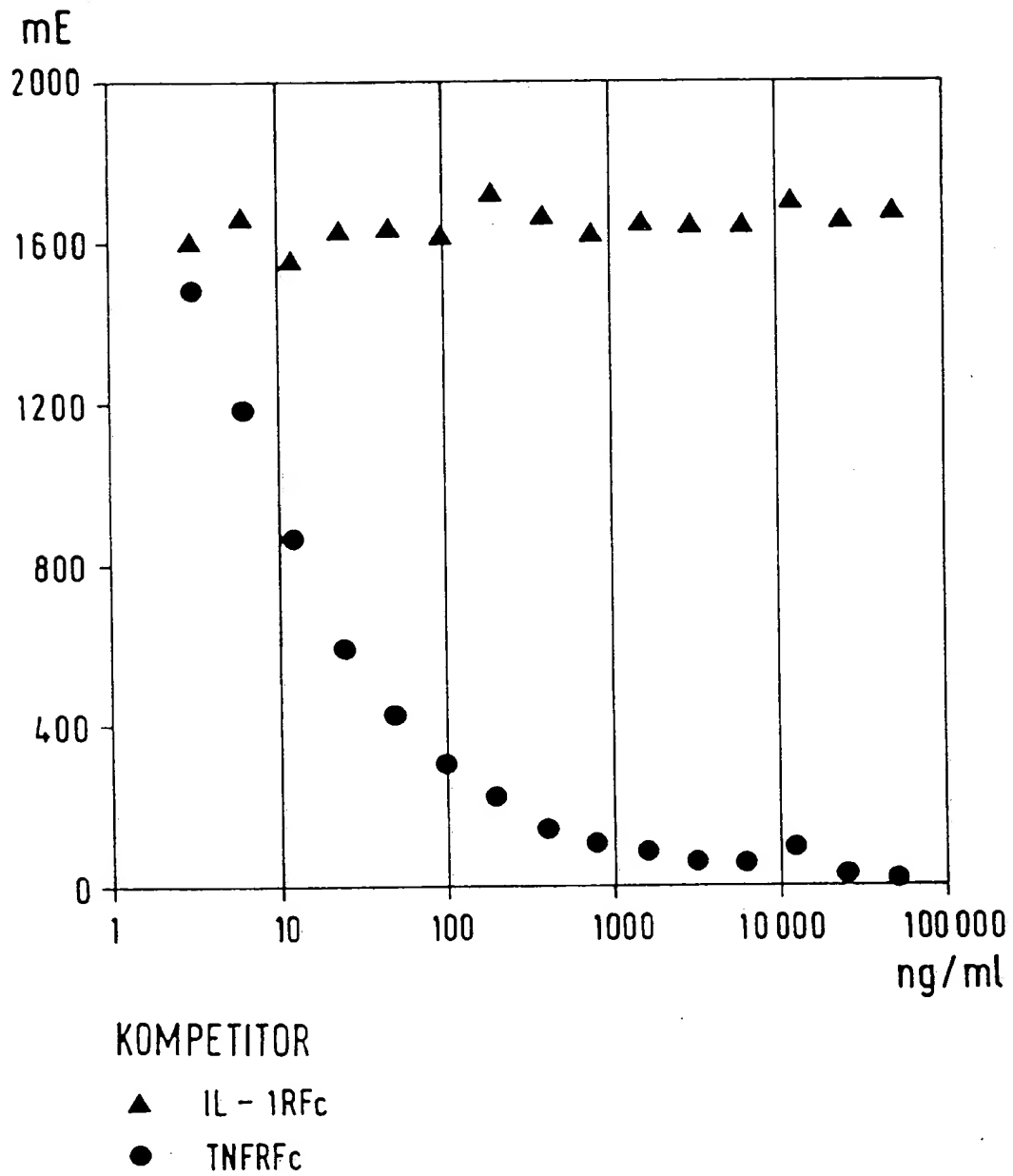
Fig. 8



KOMPETITOR

- ▲ TNF - alpha
- IL - 4
- ◇ IL - 1 - alpha
- IL - 3
- + GM - CSF

Fig. 9



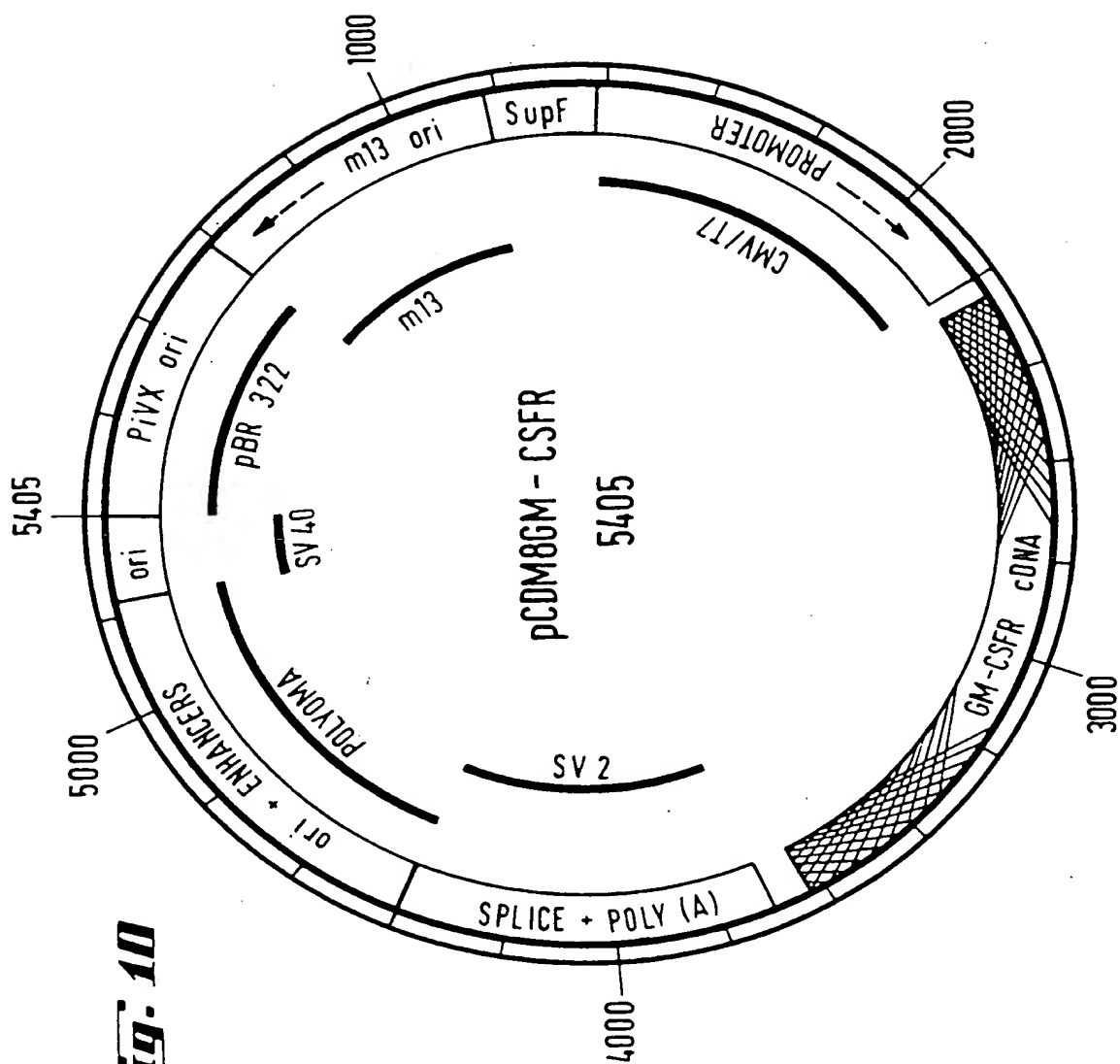


Fig. 10

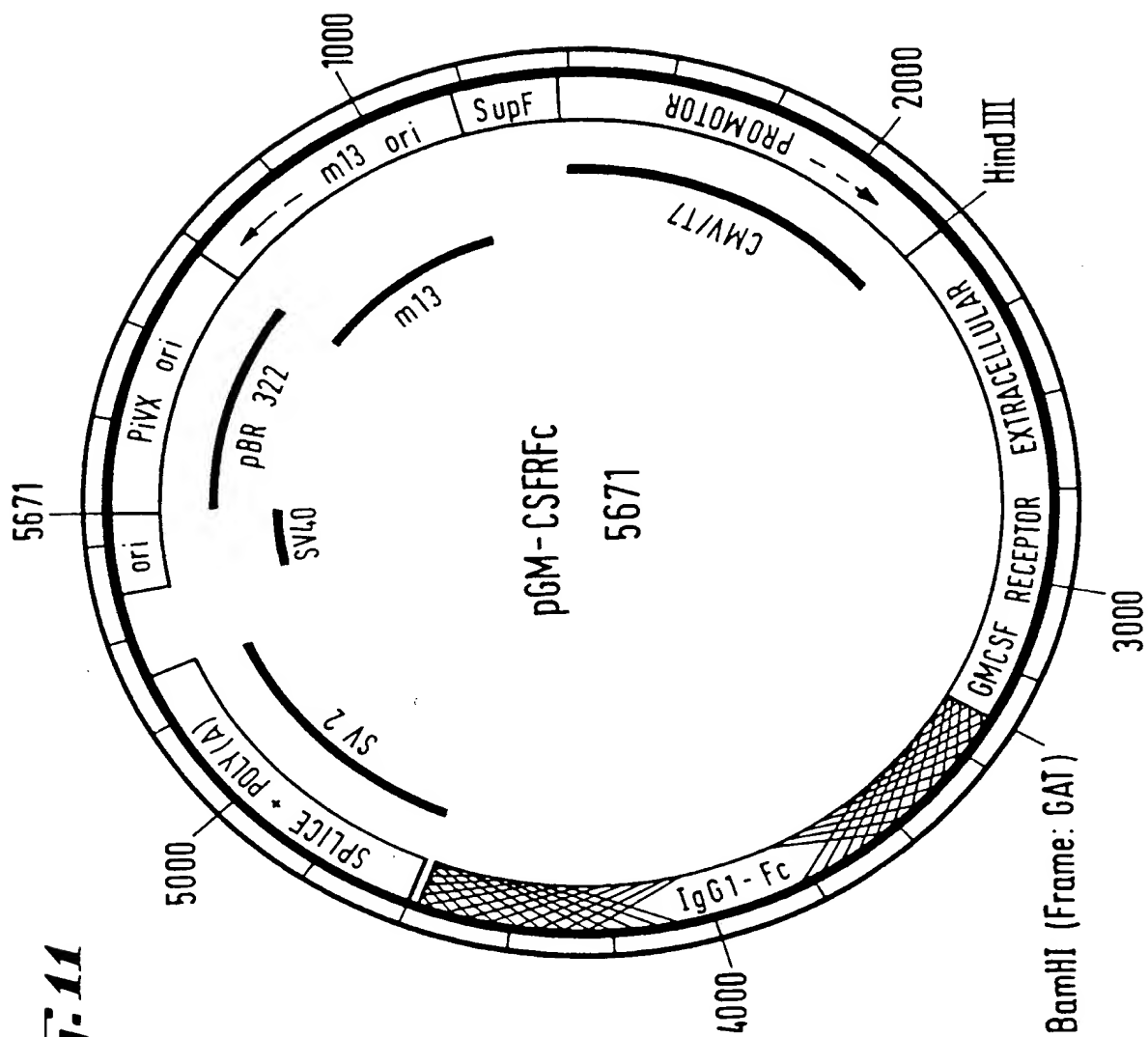


Fig. 11

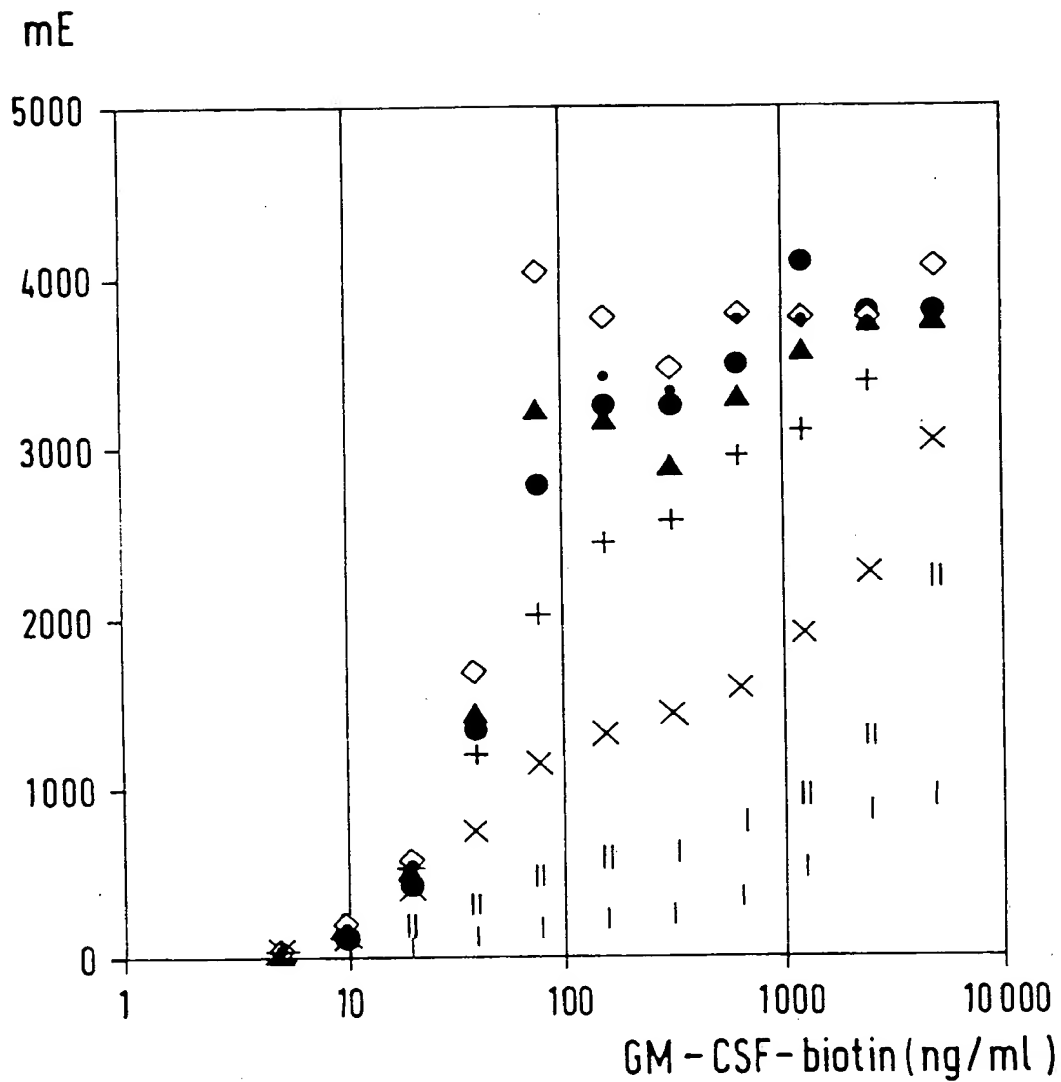
PRIMARSTRUKTUR VON GM-CSFRFc

```

1  MLLLVTSLLL CELPHPAFLL IPEKSDLRTV APASSLNVRF DSRTMNLSDW
   |-----
51  CQENTTFSKC FLTDKKNRVV EPRLSNECS CTFREICLHE GVTFEVHVNT
   -----human GM-CSF receptor-----
101 SQRGFQOKLL YPNSGREGTA AQNFSCFIYN ADLMNCTWAR GPTAPRDVQY
   -----(extracellular)-----
151 FLYIRNSKRR REIRCPYYIQ DSGTHVGCHL DNLSGLTSRN YFLVNGTSRE
   -----
201 IGIQFFDSSL DTKKIERFNP PSNVTVRCNT THCLVRWKQP STYQKLSYLD
   -----
251 FOYQLDVHRK NTQPGTENLL INVSGDLENR YNFPSSSEPPRA KHSVKIRAAD
   -----
301 VRILNWSSWS EAIEFGSEDP EEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP
   -----||-linker und hinge-||-----
351 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
   -----CH2-----
401 QYNSTYRVVS VLTVLHQWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
   -----||-----
451 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
   -----CH3-----
501 PVLDSGGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
   -----
551 GK
   --

```

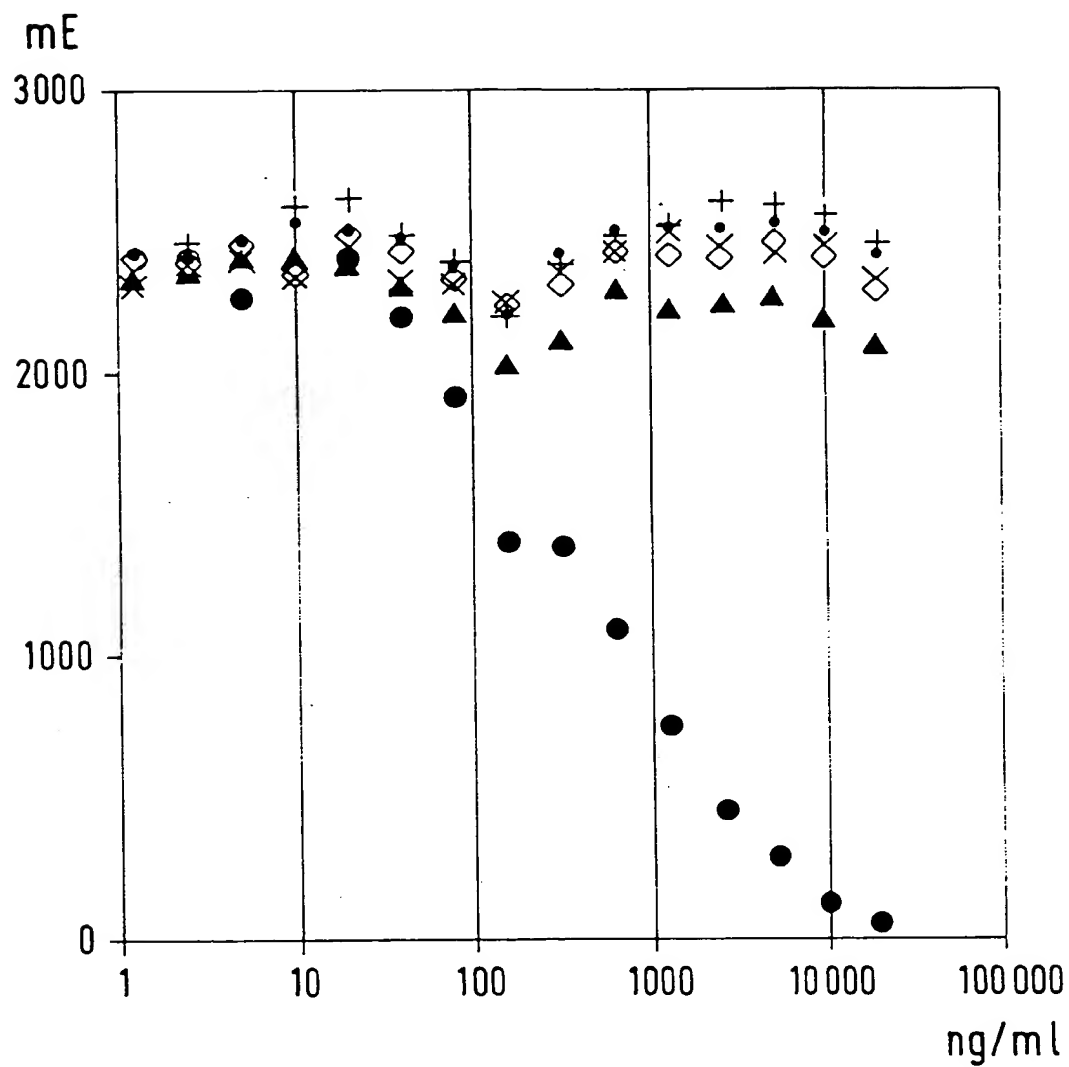
Fig. 12



GM - CSFRc

- ▲ 1400 ng/ml
- 700 ng/ml
- ◇ 350 ng/ml
- 175 ng/ml
- + 87.5 ng/ml
- × 43.8 ng/ml
- || 21.9 ng/ml
- | 11 ng/ml

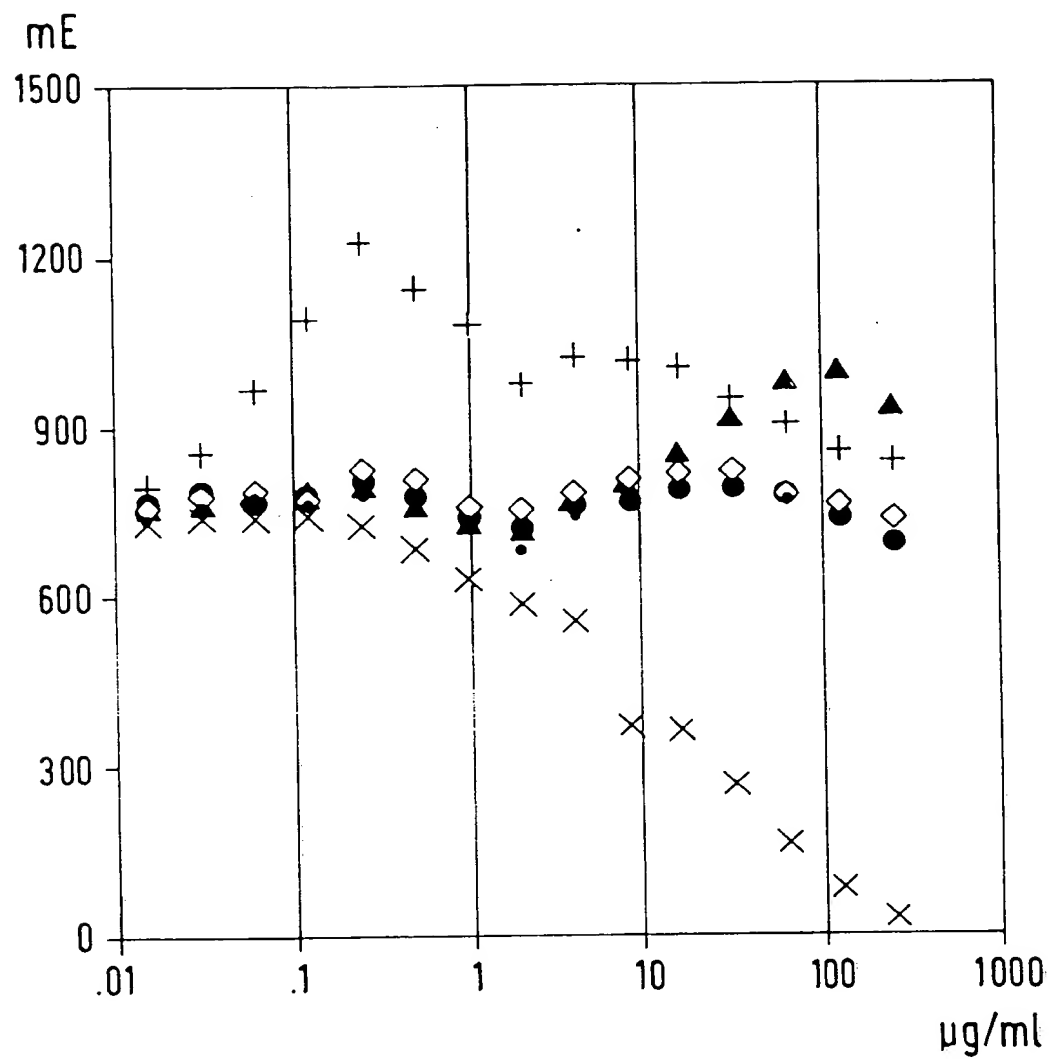
Fig. 13



KOMPETITOR

- ▲ TNF-alpha
- GM-CSF
- ◇ G-CSF
- IL-3
- + IL-4
- × IL-1-alpha

Fig. 14



MONOKLONALER ANTİKÖRPER

- ▲ 691/A40
- BMA 031
- ◇ 799/3
- 3.G 11
- + 932/453
- × 699/779

Fig. 15



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 12 0187

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	EP-A-0 327 522 (P-A. NYGREN)	1, 9, 13, 14, 20, 24, 26, 28, 30, 31	G01N33/68 G01N33/566 G01N33/543 //C12N15/62
Y	* Spalte 1, Zeile 1 - Spalte 4, Zeile 13; Ansprüche *	2-5, 8, 14-19, 25	
A, D	EP-A-0 325 262 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) * Seite 1, Zeile 1 - Seite 10, Zeile 26 *	1, 2, 7, 8-15, 1724, 31	
A, D	EP-A-0 314 317 (GENETECH, INC.) * Seite 1, Zeile 1 - Seite 5, Zeile 18 *	1, 2, 7, 8, 10-12	
A	WO-A-8 809 344 (CREATIVE BIOMOLECULES, INC.)	1, 31	
A	* Seite 5, Zeile 1 - Seite 8, Zeile 23; Ansprüche *		
A	EP-A-0 244 221 (GENETECH, INC.) * Seite 1 - Seite 12; Ansprüche *	1-5, 8, 13, 14, 19, 25	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
P, Y	WO-A-9 117 252 (NOVO NORDISK) * das ganze Dokument *	2-5, 8, 14-19, 25	G01N C12N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchemort DEN HAAG		Abchlußdatum der Recherche 18 MAERZ 1992	Prüfer HITCHEN C. E.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

THIS PAGE BLANK (USPTO)